

LC/MS/MS を用いたマダイ中のクロラムフェニコール分析事例

西川 徹・馬場 強三・村上 正文

Analysis of Chloramphenicol Using Liquid Chromatography / Tandem

Mass Spectrometry in Sea Bream.

Toru NISHIKAWA, Tsuyomi BABA, Masafumi MURAKAMI

Key words: Sea Bream, chloramphenicol, liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS)

キーワード: マダイ、クロラムフェニコール、高速液体クロマトグラフ - タンデム質量分析

はじめに

クロラムフェニコールはグラム陽性菌、グラム陰性菌、リケッチア属、トラコーマクラミジア等に対して幅広い抗菌スペクトルを有することから、感染症等に非常に有用である。しかし同時にクロラムフェニコールは骨髄増殖細胞抑制作用や再生不良性貧血、Gray Syndrome などの重篤な副作用を引き起こす恐れがあり¹⁾、2006年に施行される残留農薬等のポジティブリスト制度の暫定基準案においても「不検出」となっている。

今年、長崎県内で養殖されたマダイが韓国へ輸出された際、輸入時の検査によりクロラムフェニコールが検出され、積戻し措置が講じられた事例があった。そこで、同養殖業者から国内向けに出荷されるマダイについて安全性を確認するために、LC/MS/MSによる高感度な分析法を検討し、マダイ6検体について検査を行なったので報告する。

調査方法

1 試料及び試薬

分析法の検討には県内産のマダイを用いた。また、クロラムフェニコールの標準品は関東化学(株)製を使用した。クロラムフェニコール標準溶液は標準品10mgを正確に精秤し、メタノールで溶解させて50mlとした。この標準原液を適宜移動相で希釈して検量線作成に使用した。

Sep-Pak Plus Silica (690mg): Waters社製、あらかじめ、アセトン5ml、ヘキサン10mlでコンディショニングを行い、使用した。

メタノールやアセトニトリル、蒸留水は関東化学(株)製の高速液体クロマトグラフ用を使用し、アセトン及びヘキサンは関東化学(株)の残留農薬用(5000倍濃縮)を用いた。

その他の試薬は特級品を用いた。

2 分析装置

(1) 高速液体クロマトグラフ
島津製作所製 LC-VP システム(2) 質量分析装置
Applied Biosystems社製 API2000

3 分析条件

(1) 高速液体クロマトグラフ
分析カラム: 東ソー(株)社製 TSK-gel Super ODS
(2.0mm i.d. × 100mm, 粒子径2µm)

カラム温度: 室温

移動相はA液に5mM酢酸アンモニウム含有0.1%ギ酸水、B液にアセトニトリルを用い、次の条件でグラジエント分析を行なった。

グラジエント条件

Time(min)	A液	B液
0	95	5
1	95	5
6	5	95
10	5	95
10.1	95	5
15	95	5

流速: 0.2 ml / min

試料注入量: 10 µl

(2) 質量分析装置

イオン化法: ESI negative
 イオンスプレー電圧: - 3.5kV
 イオンソース温度: 500
 Declustering Potential: - 16V
 Collision energy: - 44V
 Monitor ion: Q1 ; 320.9
 Q3 ; 121.1

4 分析方法

前処理法については通知法²⁾に準じた。

(1) 抽出

試料 10g を 100ml 遠沈管に入れ、アセトニトリル 50ml 及び無水硫酸ナトリウム 20g を加えてホモジナイズを行い、3,000rpm、5 分間遠心分離した。上清を 200ml 分液ポートに移し、アセトニトリル飽和ヘキサン 50ml を加えて 5 分間振とうして、アセトニトリル層を 200ml ナスフラスコに移した。さきに遠心分離した残留物にアセトニトリル 50ml を加え、ホモジナイズし、3,000rpm、5 分間遠心分離を行った。分離後、さきに分離したアセトニトリル飽和ヘキサンの入った分液ポートに上清を移し、5 分間振とうした。アセトニトリル層を先のアセトニトリル層と同じナスフラスコに合わせ入れ、n-プロパノール 10ml を加えてロータリーエバポレーターにより減圧乾固した(40)。残留物にアセトン-ヘキサン(5:95)10ml を加えて溶解し、抽出液とした。

(2) 精製

抽出液をコンディショニングした Sep-Pak Plus Silica (690mg) へ負荷し、次いで 5%アセトン-ヘキサン 10ml で洗浄した。洗浄後、60%アセトン-ヘキサン 10ml で溶出し、溶出液を N₂ パージで乾固させ、移動相 10ml に溶解し、0.2 μm フィルターでろ過して試験溶液とした。

(3) 検量線

上記方法によって調整されたマダイのブランク溶液に、マダイ 1g あたり 0.5ng、1.0ng、5.0ng、10ng に相当する量のクロラムフェニコールを添加し、得られた標準液から作成した検量線により定量を行った。

5 回収試験

県内産のマダイに最終試験溶液濃度が 10ng/g になるように添加して行った。

結果と考察

1 分析条件の検討

液体クロマトグラフ条件の検討

移動相については通知法では 10mM ギ酸アンモニウ

ム:メタノール(3:1)となっているが、ギ酸、酢酸、ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなどの揮発性酸(塩)について検討したところ、5mM 酢酸アンモニウム溶液に 0.1% になるようにギ酸を添加した溶液で最もクロラムフェニコールのイオン化が促進された。また有機溶媒はカラム圧等を考慮してアセトニトリルを用いた。分析時間は 10 分としたが、機器を安定させる為に A 液の割合を 95% にして 5 分間安定化した。

質量分析計の条件の検討

通知法²⁾では APPI 法(大気圧光イオン化法)での分析が例示されているが、汎用されている ESI による MRM 法の条件を検討したところ、クロラムフェニコールはネガティブイオンの方が高感度であった。イオン源の条件についてはフローインジェクション法(FIA)により最適な条件を決定した。

次にインフュージョンポンプを用いた MRM 法によりクロラムフェニコールのプリカーサーイオン(Q1)を検討したところ、m/z 320.9 が最も強度が高かったので、m/z 320.9 をプリカーサーイオンとした。また、このプリカーサーイオンのプロダクトイオン(Q3)を測定したところ、m/z;121.1 のフラグメントイオンが最も強度が高かったのでプロダクトイオンは m/z 121.1 とした。

2 前処理法の検討

前処理は通知法²⁾に準じ、アセトニトリルによる抽出、ヘキサンによる脱脂を行い、Sep-Pak Plus Silica (690mg) で精製を行った。マダイ溶液中に含まれるクロラムフェニコールの Sep-Pak Plus Silica (690mg) での溶出条件について検討を行ったところ、10%アセトンヘキサン 10ml ではクロラムフェニコールが溶出したが、5%アセトン-ヘキサン 10ml では溶出はみられなかった。また、60%アセトン-ヘキサン 10ml で完全に溶出したため、5%アセトン-ヘキサン 10ml で洗浄、60%アセトン-ヘキサン 10ml で溶出とした。本精製法により、妨害ピークの無い良好なクロマトグラムが得られた。

3 検量線

マダイのブランク溶液に、マダイ 1g あたり 0.5ng、1.0ng、5.0ng、10ng に相当する量のクロラムフェニコールを添加し、得られた標準液から作成した検量線を作成したところ、良好な検量線を得た($r^2=0.9995$)。

また、検出下限値は 0.15 ng/g(S/N=3)であり、APPI による通知法と同程度であった。

4 回収試験

Fig1 にマダイのブランク試料にクロラムフェニコール標準溶液を添加したクロマトグラムを示す。特にマダイ試料からは妨害ピークはみられなかったが、試料由来のマトリックス成分によるイオン化促進がみられたため、マダイのブランク試料にクロラムフェニコールを添加して作成した検量線を用いて回収率の算出を行なったところ、回収率71.3%、変動係数9.5%であった。Codexで定められている食品中の動物用医薬品の濃度が1～10 ng/gの場合は回収率60～120%、変動係数30%以下とされているが³⁾、今回の結果はそのCodex基準を満たすものであり、再現性も確認されたため、クロラムフェニコールの分析法として有用であると考えられる。

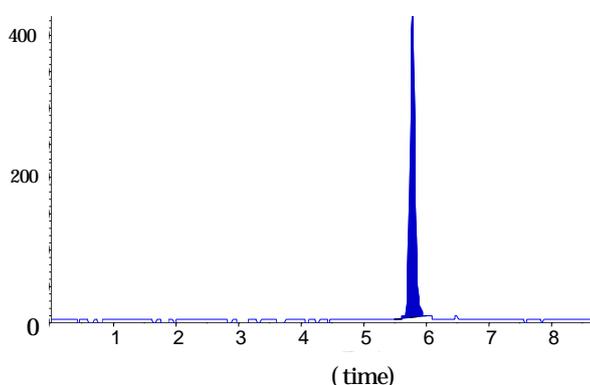


Fig1: マダイのブランク溶液にクロラムフェニコールを5ng/g になるように添加した時のクロマトグラム

5. クロラムフェニコールの残留実態調査

本試験法を用いて、マダイ6検体について残留実態調査を行なったところ、クロラムフェニコールは検出されなかった。

まとめ

現行の通知法²⁾では、畜水産食品のクロラムフェニコールの検査対象食品は豚肉(肝を除く)、鶏肉、ウナギ、エビと定められているが、今回の検討した結果、前処理法においてはマダイにおいても有用であると考えられる。

また、通知法ではAPPIによるイオン化法が例示されていたが、ESI(-)によるイオン化法においても高感度の定量が可能であった。

参考文献

- 1) Chen.J, Animal Models for Acquired Bone Marrow Failure Syndromes. Clinical Medicine & Research, 3(2), 102～108 ,(2005)

- 2) 厚生労働省医薬局食品安全部監視安全課長通知「クロラムフェニコールの分析法について」平成 17 年1月12日、食安監発第0112002号
- 3) Codex Guideline for the Establishment of a Regulatory Program for Control of Veterinary Drug Residues in Foods. 38～46, (1993)

